

第 23 卷第 4 期
2001 年 12 月

江西农业大学学报
Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis

Vol. 23, No. 4
Dec. ,2001

文章编号 :1000 - 2286(2001)04 - 0487 - 05

丹参抗氧化成分及其分布特性

李磊^{1,3}, 胡广林², Frank S. C. Lee³, 王小如²

(1. 江西农业大学 食品科学系, 江西 南昌 330045; 2. 厦门大学 化学化工学院现代分析科学教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 3. 香港浸会大学 中医药研究所, 香港浸会大学 - 厦门大学中药研究联合实验室)

摘要:借助超声波萃取法、以反相高效液相色谱(RP - HPLC - DAD)为分析检测手段,研究了丹参 6 种抗氧化成分的提取方法和分离定量条件,并对这些成分在全株丹参不同部位中的含量分布特征进行了探讨。结果表明:常温下的超声波萃取可避免热解作用给丹参酮类化合物带来的损失,而辅助的加热处理可使原儿茶醛获得较高的提取率,两种操作方法简单可行。6 种化学成分在丹参不同部位及不同等级中的分布有较大差异。丹参酮类化合物主要分布在根部皮层,而叶子中丹参素的含量却较为丰富,可为丹参品质鉴定和质量标准研究及该资源的综合利用奠定理论基础。

关键词:丹参; RP - HPLC - DAD 超声波萃取; 抗氧化成分; 分布

中图分类号: Q946 **文献标识码:** A

Content and Distribution Characteristics of Anti - oxidant Components from *Salvia miltiorrhiza* Bge

LI Lei^{1,3}, HU Guang - lin², Frank S. C. Lee³, WANG Xiao - ru²

(1. Department of Food Science, JAU, Nanchang 330045, China; 2. The Key Lab of Modern Analytical Science of MOE, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 3. Institute of Advanced Chinese Medicine of Hong Kong Baptist University, Kowloon Tong, Hong Kong, China)

Abstract: Extract method and determination parameters for 6 anti - oxidants from *Salvia miltiorrhiza* Bge (Danshen) were reported by means of microwave oven and Reversed - Phase - High - Performance - Liquid - Chromatography (RP - HPLC). These components in different tissue of Danshen were also discussed. The results showed that the loss of tanshinones caused by heating depression could be avoided by means of microwave method at the room temperature, and a higher extraction yield was also obtained by heating. The two extraction methods were simple and easy to operate. The content of tanshinones and salvia acids varied with different tissue and grades. Tanshinones were mainly in cortex of Danshen root, and Danshensu in its leaves. It has great significance for Danshen identification and quality control.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bge; RP - HPLC ultrasonic extract; antioxidant; distribution

0 前 言

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bge)系鼠尾草属植物,传统以其干燥根茎入药,用于实验动物和临床具有祛瘀止痛、活血通经、清心除烦和滋补作用,并在人类心脑血管疾病、癌症、抗衰老等方面具有良好的治疗效果^[1~3]。

收稿日期:2001 - 10 - 20

基金项目:香港特别行政区创新科技署创新基金和厦门大学现代分析科学教育部重点实验室开放基金共同资助

作者简介:李磊(1968 -),男,工学博士,江西农业大学副教授,从事食品化学研究

丹参中化学成分主要分为两类:脂溶性二萜醌类化合物和水溶性酚性酸类成分,前者主要是指丹参酮 A、丹参酮和隐丹参酮等,具有萜醌类化合物的基本特性;后者主要包括丹参素、原儿茶醛及原儿茶酸等。这些化学成分性质不稳定,本身具有较强的还原性,是良好的抗氧化剂。如何从丹参中提取并保留较大的抗氧化成分为许多学者所关注^[4~6]。

我们在对丹参 GAP 进行研究的发现,丹参中的这些成分受提取方法的影响较大。《中国药典》(2000 年版一部)以丹参酮 A 作为丹参质控的指标,并规定了其提取和测定的方法,但丹参酮 A 在湿热条件下有降解趋向^[7,8]。为此,我们采用了一种简明的方法,用于提取和测定丹参中的化学成分,并用该方法研究了不同等级丹参及丹参不同部位中化学成分的分布特点,取得了良好效果。

本文提出了用于丹参中化学成分提取和测定的新方法,并首次全面研究了丹参中化学成分的分布特点,为丹参质量控制、品质鉴定和分级提供依据,也为进一步扩展丹参的药用部位和该资源的综合利用奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要实验仪器及操作条件 HP1100 型高效液相色谱仪,色谱柱为 Alltima 250 mm × 4.6 mm, 5 μC18 反相柱。脂溶性成分的测定条件是:流动相为甲醇水 = 80/20 (体积分数 = 4);检测波长为 254 nm (带宽 16 nm);参比波长 360 nm (带宽 16 nm);柱温,室温;流速:1.0 mL/min;进样 20 μL。水溶性成分的测定条件是:流动相为乙腈 (体积分数 = 0.5%) 冰醋酸 = 10/90;检测波长为 280 nm (带宽 16 nm);参比波长 360 nm (带宽 16 nm);柱温,室温;流速:1.0 mL/min;进样 20 μL。

1.1.2 化学试剂 甲醇、乙腈、二氯甲烷为色谱纯 (Fisher);冰醋酸和氯水为分析纯 (上海化学试剂厂);试验用水为经过 Milli-Q 水处理系统的超纯水 (18 M)。丹参酮、隐丹参酮、丹参酮 A、原儿茶酸、原儿茶醛标准品购自中国药品和生物制品鉴定所 (北京);丹参素钠购自上海医科大学。

1.1.3 丹参样品 2000 年 11 月采自某丹参产业基地的新鲜丹参样品,丹参加工厂内的优级、一级、二级、三级商品丹参,采自全国其它 6 个地区的丹参样品。

1.2 实验方法

1.2.1 脂溶性成分的提取方法 (1) 湿热条件下丹参酮 A 的稳定性。以甲醇 - 二氯甲烷 (体积分数 = 4/1) 为溶剂,将丹参酮 A 溶解成浓度为 185.1 μg/mL 的溶液,然后进行热回流,分别在 10, 20, 30, 40, 50 min 取微量测定丹参酮 A 的含量。(2) 提取方法的比较。本研究选用文献上报道的丹参有效成分提取方法,包括:冷浸提法、热浸提法、《中华人民共和国药典》(2000 年一版) (简称 POC 法) 及王慕邹法进行提取并与超声波法比较 (见表 1)。

表 1 5 种不同提取方法条件

项目	温度 /	溶剂	样品重 / mg	提取时间 / h
超声浸提	室温	10 mL CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH (1/4)	75	0.5
冷浸提	室温	50 mL CH ₃ OH	300	72
热浸提	57	50 mL CH ₃ OH	300	72
药典法	64	50 mL CH ₃ OH	300	1
文献法	室温	10 mL CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH (4/1)	75	1

1.2.2 超声波提取最佳溶剂比的确定 不同混合溶剂比例 (CH₂Cl₂ - CH₃OH, 体积分数) 包括: 0/10, 1/9, 2/8, 3/7, 4/6, 5/5, 6/4, 7/3, 8/2, 9/1, 10/0。超声波提取的方法是:准确称取 75 mg 丹参粉末 (过 50 目筛), 放入 10 mL 带塞三角瓶中。准确加入不同比例的二氯甲烷/ 甲醇

混合溶剂 10 mL, 超声波振荡提取 30 min, 然后用快速定性滤纸 (whatman1 #) 过滤, 所得提取液即为供试液。进 HPLC 之前再用微孔滤膜过滤。

1.2.3 水溶性成分的提取方法 准确称取 0.5 g 丹参或其它样品粉末 (过 3 号筛), 放入 100 mL 带塞瓶或小烧杯中。准确加入 = 2% 氨水 50 mL, 超声波振荡提取 60 min, 然后在沸水浴中加热提取 40 min, 赶出溶液内大部分氨, 冷却至室温, 用约 4 mL 冰醋酸调至 pH3 ~ 3.5, 加蒸馏水补足至刻度, 混匀, 静置 2 h 后用快速定性滤纸 (whatman1 #) 过滤, 所得提取液即为供试液。进 HPLC 之前再用微孔滤膜过滤。

1.2.4 丹参样品的处理方法 对于所采整株丹参样品,先将其分为叶、枝、根茎三大部分,分别自然干燥,筛选有代表性的主根分为皮部和木质部两部分。所有样品在自然状态下阴干至原重的 25 %左右后,除去表面尘土或须根等,将根剪(切)成约 1 cm 长的小段(片),继续阴干 1 d。然后在 60 ℃下烘至原重的约 15 % (约需 5 h),取出粉碎过 50 目筛,每个样品用四分法均匀取样三份进行超声波化学成分萃取。对于所取皮部样品要称它的重量和测它的厚度(见表 2)。取自丹参加工厂内和其它产地的商品药材可直接分段粉碎过筛。

表 2 5 个样品皮部采样情况

样品号	皮厚度 / mm	皮重 / g	木质部重 / g
1	0.6	5.10	4.84
2	2.0	15.20	8.63
3	1.5	6.86	3.97
4	0.5	2.29	2.00
5	1.2	1.48	0.85

2 结果与分析

2.1 分析条件及准确性

10 μL 脂溶性混标连续进样 8 次的峰面积(RSD)为 1.2 %~2.7 %;测定 30 个样品后重复进标准的峰面积(RSD)为 1.4 %~1.8 %。标准曲线拟合方程为: $Y = 3\,933.5 X - 1.155$ ($R = 1$);丹参酮 I: $Y = 5\,719.7 X - 7.403\,7$ ($R = 0.999\,8$);丹参酮 A: $Y = 4\,171.1 X - 1.023\,8$ ($R = 1$)。Y:峰面积;X:进样量(μg);样品加标回收率分别为 97 %,94 %,101.2 %。

10 μL 水溶性混标连续进样 8 次的峰面积(RSD)为 1.4 %~2.9 %;测定 30 个样品后重复进标准样的峰面积(RSD)为 1.2 %~2.5 %。标准曲线拟合方程为: $Y = 2\,082.5 X + 30.363$ ($R = 0.999\,9$);原儿茶酸: $Y = 479.03 X - 6.7\,898$ ($R = 1$);丹参素: $Y = 722.07 X - 6.279\,3$ ($R = 0.997$)。Y:峰面积;X:进样量(μL);样品加标回收率分别为 95 %,98 %,97 %。

2.2 脂溶性成分的提取方法比较

本研究与文献[7]中有关丹参酮 A 在水溶液中受热降解报道的结果相似,在模拟提取、有机溶液湿热处理条件下丹参酮 A 的加热变化降解也较快。尤其是在热回流 20 min 后,其变化趋势更为明显。热回流 50 min 后,丹参酮 A 的浓度降为原来的 65.1 %(图 1)。因此,为尽可能多地从丹参中提取有效成分,并减少操作过程中的损失,本研究探讨了几种提取方法对有效成分提取量的影响,尤其是非热处理与提取量的关系。结果表明:常温下的超声波萃取能较多地提取丹参酮类有效成分,相对于原药材的提取率较其它 4 种方法显著提高(图 2)。

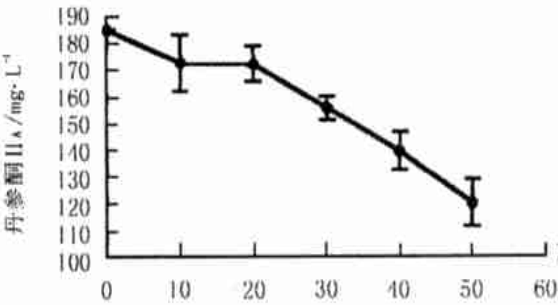


图 1 湿热条件下热回流时间对丹参酮 A 的影响
(溶剂:甲醇/二氯甲烷,体积分数 = 41)

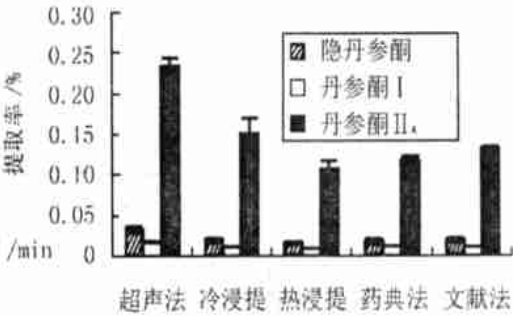


图 2 不同方法对丹参酮类化合物提取率比较

在超声波萃取条件下,本文又探讨了混合萃取剂 CH₂Cl₂ - CH₃OH(V/V)不同体积比对丹参酮类化合物提取率的影响。实验表明:在体积比 CH₂Cl₂ - CH₃OH 为 2/8 时,3 种丹参酮类化合物的提取率最高(表 3)。因此,本文选 CH₂Cl₂ - CH₃OH(体积分数 = 28)为萃取剂,USE 条件下萃取 30 min 作为丹参酮类物质的提取条件。

2.3 丹参化学成分的含量和分布

2.3.1 不同等级丹参中丹参酮含量的比较 传统方法对丹参药材的分级以其规格大小及表面感官为依据。一般认为,丹参根茎粗大、有一定长度、表面无杂无破损者为质量较好的产品;相反,根茎细小、表面有损者为劣质丹参。但丹参酮类化合物含量测定结果(表 4)并不表明优级丹参中有效成分的含量高,或劣等丹参中有效成分的含量少。在本实验结果中,低等丹参中丹参酮_A的含量最高(0.326%),比优级丹参中的含量(0.251%)高约 30%。从这个意义上讲,对于丹参等级的划分应结合丹参外形及有效成分的含量给予合适的权重综合考虑,这样更为合理。

2.3.2 丹参酮类化学成分的含量及分布 丹参中丹参酮类化学成分的含量随不同的生长地区有较大差异(表 5)。在实验所选择的 6 个地区的丹参样品中,丹参酮_A的含量范围在 0.015%~0.735%之间。所以,对于不同产地的丹参,在入药时应区别对待处理。

丹参全植物不同的组织器官中丹参酮的含量有很大差异。丹参酮主要分布在丹参根茎部(图 3),地上部分的枝叶中含量较少,这说明了丹参根茎药用的合理性。但是,丹参酮类化合物在丹参根茎中的分布并不是均一的。所研究的 3 种丹参酮主要集中在根茎皮部,木质部中含量极少(图 4)。

表 3 不同溶剂比对丹参酮提取量的影响

μg/ mg, $\bar{X} \pm S$, $n = 3$

CH ₂ Cl ₂ - CH ₃ OH (V/ V)	隐丹参酮	丹参酮	丹参酮 _A
0/10	306.3 ±11.03	145.5 ±5.966	2 013 ±110.7
1/9	349.2 ±11.78	164.6 ±7.407	2 365 ±89.87
2/8	350.4 ±13.67	169.6 ±6.954	2 436 ±102.3
3/7	338.8 ±11.52	175.8 ±8.966	2 311 ±90.13
4/6	357.3 ±15.72	161.9 ±6.962	2 403 ±110.5
5/5	340.5 ±18.39	162.4 ±7.795	2 486 ±151.6
6/4	342.7 ±21.93	157.7 ±8.358	2 414 ±104.2
7/3	322.4 ±10.96	148.2 ±8.892	2 134 ±96.03
8/2	259.3 ±19.19	133.4 ±4.135	1 925 ±105.9
9/1	244.6 ±8.316	118.8 ±5.346	1 772 ±99.23
10/0	182.9 ±8.048	87.88 ±2.724	1 518 ±83.49

表 4 各种等级丹参中丹参酮类化学成分的含量 $n = 3, \%$

丹参等级	隐丹参酮		丹参酮		丹参酮 _A	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
优级	0.043	3.43	0.017	6.09	0.251	3.32
一级	0.037	1.26	0.011	3.51	0.204	1.30
二级	0.038	3.52	0.015	2.30	0.235	4.12
三级	0.053	1.68	0.020	2.61	0.326	1.85

表 5 不同产地丹参中丹参酮类化学成分的含量 $n = 3, \%$

产 地	隐丹参酮		丹参酮		丹参酮 _A	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
北京	0.021	5.26	0.013	3.20	0.091	5.11
甘肃	0.249	6.10	0.101	5.24	0.753	2.45
陕西	0.217	6.32	0.038	1.20	0.195	1.52
山东	0.318	4.23	0.113	2.01	0.426	4.20
江苏	0.007	2.01	0.005	1.05	0.015	6.35
四川	0.086	2.05	0.023	3.25	0.38	8.02

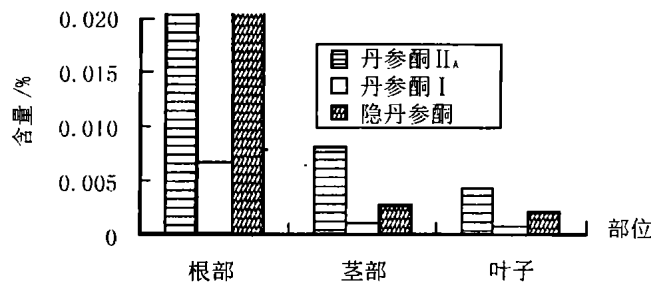


图 3 丹参酮类化合物的含量分布

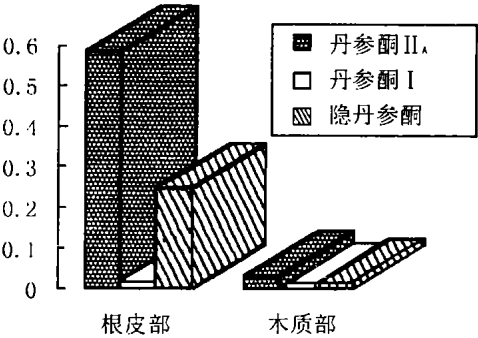


图 4 丹参酮类化合物在根皮部和木质部中的分布

我们对丹参根皮部厚度与丹参酮_A含量的关系进行了研究,结果发现皮部越厚,丹参酮_A的含

量越低,从一个侧面说明了丹参酮类成分主要分布在根皮表面。不同规格和大小的丹参药材,其皮部与木质部的比各有不同,皮的厚薄也有差异,这进一步验证了丹参根部规格与成分含量的非相关性。

2.3.3 丹参水溶性成分的含量及分布 与丹参酮类化学成分类似,丹参中水溶性酚酸类成分在不同地区的产品间也有较大差异(表 6)。丹参素的含量在 0.02 % ~ 0.601 % 之间,原儿茶醛的含量在 0.007 % ~ 0.196 % 之间。相对于前两种成分,原儿茶酸类含量较少。

与丹参酮类化合物相比,丹参酚酸类成分在全植株中的分布自有特点。原儿茶醛在丹参根部分布最多,含量约为 0.148 %,在地上各部分中的含量相近;原儿茶酸在全植株各部位中的含量分布较为一致;但丹参素的含量以叶中为高,达 1 % 以上,其次为根茎部,约为 0.3 % 以上,丹参素在枝中含量最少。丹参素是丹参中重要的有效成分之一,具有明显扩张冠状动脉并使其血流量增加的作用,对血液循环障碍、心肌缺血、心肌梗死也有良好的治疗效果。从这方面来说,丹参叶具有潜在的应用价值。

丹参素和原儿茶醛在整个丹参根茎的皮部和木质部都有较多的分布。在根皮较薄的情况下,两种成分在木质部中的含量相对较高,但随着根皮的增厚,皮部中的含量高于木质部。

所以,从丹参酮和丹参酚酸类成分的分布来看,只关系到丹参酮类有效成分时可考虑皮部用药;涉及到丹参酚酸时,全株丹参都可以作为药用。

3 结 论

(1)丹参有效成分丹参酮 A 在湿热条件下发生降解作用,使有效成分的提取率降低。本研究采取了超声波辅助提取法,用反相液相色谱检测获得了良好效果,可用于实验室研究和大生产操作中丹参浸膏的制造。超声波提取辅以加热手段可使水溶性酚酸类成分在弱碱环境中更多的溶出,原儿茶醛和丹参素的取得率较高。

(2)丹参化学成分的含量随不同的生长环境而有较大差异。在所研究的 6 个丹参产地的样品中,丹参酮 A 的含量在 0.015 % ~ 0.735 % 之间,丹参素的含量在 0.02 % ~ 0.601 % 之间。因此,对于不同来源的丹参样品应分别处理。在丹参制药行业,采用丹参标准提取物投料的方法来消除由于原料本身差异带来的质量差异,很值得推广。

(3)丹参化学成分在丹参组织中的分布各有特点。丹参酮类化合物主要集中分布在根茎部的表皮;而丹参素和原儿茶醛在根茎皮部和木质部中含量都较为丰富,丹参叶中也含有大量的丹参素。所以,丹参入药应考虑不同的用药目的,来进行不同的选择和处理。

(4)传统方法对丹参等级的划分存在一定的局限性。应分别从丹参规格、外观特点及有效化学成分含量等方面综合考虑,制订适当的权重,合理分级。

参考文献:

[1]徐任生.丹参—生物学及其应用[M].北京:科学出版社,1990.158~184
[2]阴健,郭力弓.中药现代研究与临床应用(1)[M].北京:学苑出版社,1993.171~185
[3]Liu Jin, Shen Han - Ming, Choon - Nam ong. Salvia miltiorrhiza inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma Hep G2 cells[J]. Cancer Letters, 2000, 153:85~93
[4]Dean J R, Liu B, Price R. Extraction of Tanshinone A from Salvia miltiorrhiza bunge using supercritical fluid extraction and a new extraction technique, phytosol solvent extraction[J]. Journal of Chromatography A, 1998, 799:343~348
[5]苏子仁,陈建南,葛发欢,等.应用不著 SFE - CO₂ 提取丹参脂溶性有效成分工艺研究[J].中成药,1988,20(8):1~2
[6]方亮,戈延茹,郭建鹏.用均匀设计法优化丹参提取工艺[J].延边大学医学学报,1998,21(2):93~95
[7]苏子仁,刘中秋,周华.丹参醇提液在浓缩、干燥工艺过程中的化学成分变化研究()—丹参酮 A 湿热降解机理探讨[J].中成药,1997,19(11):5~6
[8]曾元儿,徐晖.烘干温度和时间对丹参乙醇浸膏中丹参酮 A 含量的影响[J].中药新药与临床药理,1997,8(1):38~